昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*, September 2007, 50(9):900－906 ISSN 0454-6296

2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺对菜青虫酚氧化酶的抑制作用

肖婷[1],薛超彬[1],解先业[2],罗万春[1,*]

(1. 山东农业大学植保学院,农药毒理与应用技术省级重点实验室,山东泰安 271018;
2. 山东农业大学化学与材料科学学院,山东泰安 271018)

摘要:为筛选对十字花科蔬菜害虫菜青虫 *Pieris rapae* (L.)酚氧化酶具有高抑制活性的化合物,为寻找新型害虫控制剂提供线索,采用酶标仪微量法以室内合成、筛选的高活性化合物 2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺为抑制剂,研究了其对菜青虫酚氧化酶的抑制活性及抑制类型。结果表明,供试化合物对菜青虫酚氧化酶的抑制中浓度(IC_{50})为 0.116 mmol/L;该化合物为典型的可逆非竞争型抑制剂,抑制常数(K_i)为 1.96 mmol/L。该化合物直接对靶标酚氧化酶产生作用,而不是通过影响酶结构内的铜离子来产生作用的。

关键词:菜青虫;酶标仪微量法;酚氧化酶;抑制剂;2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺;抑制动力学

中图分类号:Q965 **文献标识码**:A **文章编号**:0454-6296(2007)09-0900-07

Inhibitory effects of 2-hydroxy-4-methoxybenzylidene-aniline on phenoloxidase from *Pieris rapae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae)

XIAO Ting[1], XUE Chao-Bin[1], XIE Xian-Ye[2], LUO Wan-Chun[1,*] (1. College of Plant Protection, Shandong Key Laboratory of Pesticide Toxicology and Application Technique, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China; 2. College of Chemistry and Material Science, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong, 271018, China)

Abstract: To screen the obvious inhibitors of phenoloxidase (PO) from *Pieris rapae* (L.) and search after a theoretic foundation for developing the insecticide with novel modes of action, the inhibitory effects of 2-hydroxy-4-methoxybenzylidene-aniline as an inhibitor on PO from *P. rapae*, which had been partially purified, was studied by using microtitration assay. The results showed that the tested compound could inhibit PO activity obviously and the inhibitor concentration leading to 50% activity loss (IC_{50}) was estimated to be 0.116 mmol/L. The inhibitor was found to be a reversible noncompetitive inhibitor, and the K_i value was determined to be 1.96 mmol/L for the compound. Although the compound could affect PO directly, it did not chelate copper of PO active center.

Key words: *Pieris rapae*; microtitration assay; phenoloxidase; inhibitor; 2-hydroxy-4-methoxybenzylidene-aniline; inhibitory kinetics

在自然界中,无论是脊椎动物还是无脊椎动物(包括昆虫)、植物或微生物,酚氧化酶(phenoloxidase, PO, EC1.14.18.1)在其生命过程中都发挥着重要作用。早在 1905 年,Dewits 就提出昆虫的酚氧化酶与黑色素的形成有关。以后的研究表明,酚氧化酶广泛存在于动物、植物、昆虫、真菌和细菌体内,可以引起一些水果、蔬菜和甲壳类动物在贮藏期间变黑色,可作为多种植物抗病性鉴定的指标或反映植物抗病性的一个辅助生化指标,与动物黑色素合成以及在皮肤等处沉着有关(Friedman, 1996; Xu *et al*., 1997; Kobu *et al*., 2000)等。也正是由于该酶的性质和功能及其在不同生物体生命活动中的

基金项目:国家自然科学基金项目(30571237)

作者简介:肖婷,女,1982 年生,山东兖州人,硕士研究生,主要从事昆虫毒理学及环境友好农药研究,E-mail:xiaoting826448@163.com

* **通讯作者** Author for correspondence, Tel.:0538-8242983;E-mail:wcluo@sdau.edu.cn

收稿日期 Received:2007-04-03;**接受日期** Accepted:2007-06-15

作用，其生物化学、药理学和毒理学的研究引起了许多专业领域的关注(Ashida and Yamazaki，1990；Pentz and Wright，1991；季立才，1991；Micheal *et al*.，2000；冯从经等，2004)。

在昆虫体内，酚氧化酶是一种重要的酶，它对昆虫的变态发育和免疫系统起着重要作用。酚氧化酶催化完成的‘醌鞣化’作用可以促进昆虫表皮的硬化与黑化，这个过程对于具有‘外骨骼’的昆虫生命过程至关重要(罗克斯坦，1988；Li，1993)。当今，农药的发展正面临着一个关键时刻，发展‘环境友好害虫控制剂’的观念越来越深入人心，这个领域也越来越成为世界各国科学技术争相抢占的一个制高点。一般认为研究开发新杀虫剂的途径有如下四个方面，即(1)经典筛选；(2)类推合成；(3)天然产物模板；(4)生物合理设计。特别是目前‘计算机辅助分子设计’(computer aided molecular design，CAMD)用于此类研究大有前途(Xue *et al*.，2007)。酚氧化酶抑制剂的研究可以为发展新型的害虫控制剂提供重要线索，特别是研究不同昆虫酚氧化酶特性及抑制剂抑制动力学将会为发现一类全新的、专化性的、无公害昆虫控制剂提供理论基础和实践参考。

本课题组在前期研究的基础上(高兴祥等，2003，2004；谢桂英等，2003；刘春英等，2004；王树栋等，2004；薛超彬等，2004，2005，2006；罗万春等，2005；Wang *et al*.，2005a；Xue *et al*.，2005，2006)，合成了系列化合物，进行酚氧化酶抑制活性的筛选。本实验首次采用酶标仪微量法研究了经筛选出的高活性化合物2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺对菜青虫 *Pieris rapae* (L.)酚氧化酶的影响，旨在为酚氧化酶研究提供更便捷的方法，也为开发以该酶为靶标的新型害虫控制剂提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料

菜青虫采自山东泰安郊区宅子村菜园，在室内饲养至5龄(温度25℃±1℃，RH60%～70%，光周期14L∶10D)。2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺由山东农业大学化学与材料科学学院设计合成，经硅胶柱纯化，并用核磁共振、红外光谱、元素分析等方法表征了其化学结构；L-多巴(L-DOPA)购于Sigma公司，考马斯亮蓝G-250为进口分装；二甲基亚砜(DMSO)、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠和硫酸铵均为国产分析纯试剂。其他试剂均为国产分析纯。

1.2　酶液制备

采用薛超彬等(2004)方法，略有改进。取菜青虫5龄幼虫20头，按5 mL/g加入0.2 mol/L(pH 6.9)的磷酸缓冲液，放在预冷的匀浆器中冰浴匀浆，将匀浆液在4℃条件下8 000 r/min离心30 min，除去液面表层的脂类和色素，取上清液作为粗酶源；加入固体硫酸铵，使其饱和度为40%，冰浴下静置30 min，于4℃条件下8 000 r/min离心30 min，收集沉淀，加入磷酸缓冲液使其充分溶解，转移至透析袋中透析，其间更换数次透析液，直至无SO_4^{2-}检出。此初纯化酶液作为本实验测定用酶制剂。

1.3　蛋白质含量测定

采用考马斯亮蓝G-250法(Bradford，1976)测定蛋白含量，以牛血清蛋白(BSA)为标准蛋白。

1.4　酶活力测定

酶标仪微量法和紫外分光光度计比色法检测酶活力原理相同，只是在测定体系中样品用量缩减为后者的1/10。在200 μL的测活体系中，包含终浓度为0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH 6.9)，1 mmol/L L-DOPA，37℃温浴30 min，加入10 μL酶液，于Multiskan MK3酶标仪(Thermo electron corporation)振荡5 s测定。每20 s记录一个吸光度值。

1.5　2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺对酚氧化酶活力影响的测定

将抑制剂溶解于DMSO中，以L-DOPA为底物，将不同浓度的抑制剂与底物溶液混匀，采用上述方法测定120 s光密度随时间变化的增长曲线，每20 s记录一个吸光度值，得出一条直线，从直线的斜率可求得该酶活力。以每分钟催化底物氧化吸光度提高1.000定义为1个酶活力单位(U)。

1.6　2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺对菜青虫酚氧化酶的抑制类型及抑制常数的测定

参照郭勇和郑惠平(2000)方法，略有改进。在测活体系中，固定酶液浓度，改变L-DOPA的浓度，测定不同抑制剂浓度下酶活力随底物浓度变化的规律，以酶反应的初速度对底物浓度作图为一组双曲线，此结果说明酶促反应遵循米氏动力学方程。以Lineweaver-Burk双倒数作图，比较抑制剂对表观米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_m)的影响，并作Dixon图得出抑制常数(K_i)。

1.7　2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺对酚氧化酶二酚酶反应进程的影响

1.7.1　抑制剂对酚氧化酶二酚酶反应进程的影响： 参照Andrawis和Varda(1986)的方法，并略有改进。

以5 mmol/L L-DOPA为底物，在0.2 mL 0.2 mol/L的磷酸缓冲液（pH 6.9）测活体系中，包含6 μL抑制剂与50 μL底物溶液及0.1 mL磷酸缓冲液混匀，37℃温浴30 min，加入30 μL酶液，于475 nm下测定光密度随时间变化的曲线。

1.7.2 半胱氨酸溶液对酚氧化酶二酚酶反应进程的影响：依照1.7.1方法，在测活体系中，加入6 μL半胱氨酸溶液与50 μL底物溶液及0.1 mL磷酸缓冲液混匀，37℃温浴30 min，加入30 μL酶液，于475 nm下测定光密度随时间变化的曲线。

1.8 金属铜离子和酶液对2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺最大吸收波长影响的测定

1.8.1 Cu^{2+}和2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺对酚氧化酶抑制作用的比较：参照方法1.4和1.5，在200 μL测活体系中，分别测定包含20 μL 10 mmol/L Cu^{2+}、100 μL 1 mmol/L 2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺以及两者混合的酶活力，以未加入抑制剂的酶活力为标准，得出相对活力。

1.8.2 金属铜离子对2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺最大吸收波长的影响：将Cu^{2+}溶液与0.2 mol/L磷酸缓冲液（pH 6.9）和1 mL 2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺混合，在37℃恒温水浴中稳定5 min后用紫外分光光度计扫描最大吸收峰。Cu^{2+}在2 mL测定体系中的终浓度为0.3 mmol/L。

1.8.3 酶液对2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺最大吸收波长的影响：将0.1 mL酶液与0.2 mol/L磷酸缓冲液（pH 6.9）和1 mL 1 mmol/L 2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺混合，在37℃恒温水浴中稳定5 min后用紫外分光光度计扫描最大吸收峰。

2 结果与分析

2.1 蛋白含量

采用考马斯亮蓝G-250法，以牛血清蛋白（BSA）为标准蛋白，测得的标准蛋白曲线为$Y = 0.0012X + 0.6106$，以此求得酚氧化酶的蛋白含量为11.34 ± 0.02 mg/mL。

2.2 2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺对菜青虫酚氧化酶活力的影响

以2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺为抑制剂，探讨其对菜青虫酚氧化酶活力的影响，酶的剩余活力与抑制剂的浓度关系见图1。结果表明：以L-DOPA为底物，37℃条件下，随着抑制剂浓度的增大，酶相对活力逐渐下降。由系列数据计算得出，抑制剂对该酶抑制中浓度（IC_{50}）为0.116 mmol/L。

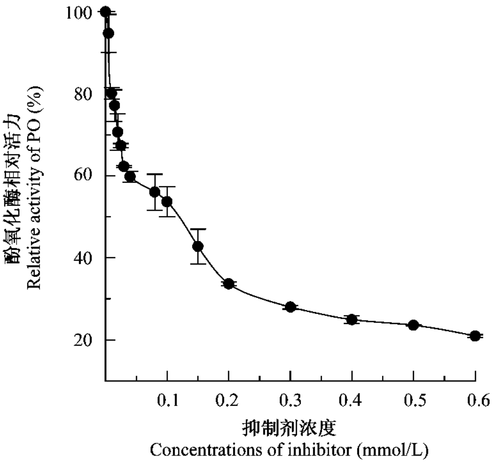

图1 2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺对菜青虫酚氧化酶活力的影响

Fig. 1 Effect of 2-hydroxy-4-methoxybenzylidene-aniline on the activity of phenoloxidase from *Pieris rapae*

2.3 2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺对菜青虫酚氧化酶的抑制效应

在测活体系中，固定底物L-DOPA的浓度，加入不同浓度的抑制剂，改变酶的加入量，测定不同抑制剂浓度下酶液量对酚氧化酶活力的影响。图2表示酚氧化酶经抑制剂作用后的剩余活力与加入酶液量之间的关系，酶活力对酶液量作图得到一组通过原点的直线，随着抑制剂浓度的增大，直线的斜率降低。此结果表明，2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺抑制酚氧化酶活力的反应为可逆性抑制。

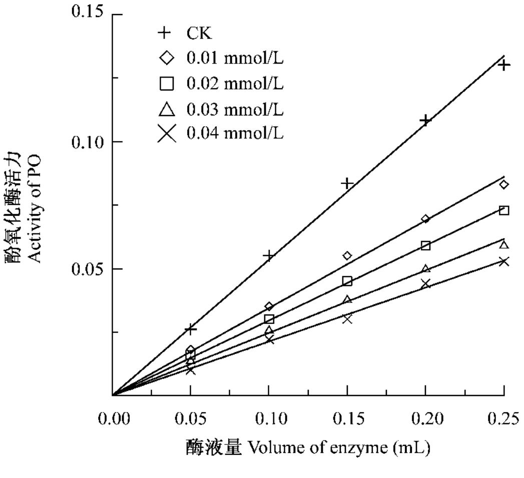

图2 不同酶液量对菜青虫酚氧化酶活力的影响

Fig. 2 Effect of enzyme concentration on the activity of phenoloxidase from *Pieris rapae* at different concentration of 2-hydroxy-4-methoxybenzylidene-aniline

2.4 2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺对菜青虫酚氧化酶的抑制类型

以L-DOPA为底物，测定不同抑制剂浓度下酶

活力随底物浓度变化的规律，以 Lineweaver-Burk 双倒数作图（图 3），得到一组相交于横轴的直线，表明抑制剂不影响米氏常数（K_m），只影响最大反应速度（V_m），其抑制类型为非竞争型抑制。K_m 值不随抑制剂浓度的增大而改变，而 V_m 则随着抑制剂浓度的增大而下降，说明抑制剂和酶分子的结合与底物分子和酶分子的结合是相互独立的，抑制剂不改变酶对底物的亲合力，抑制剂可以同时与游离酶（E）和结合酶（ES）结合。

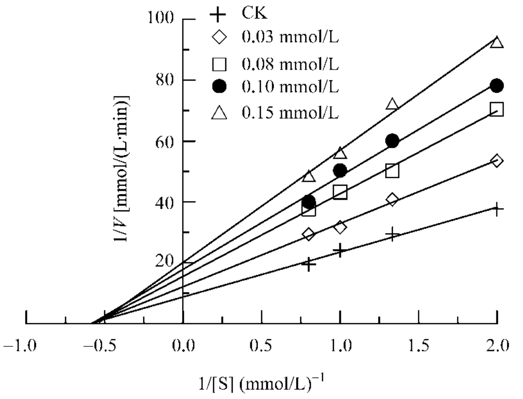

图 3　2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺对菜青虫酚氧化酶的抑制类型

Fig. 3　Lineweaver-Burk plots for inhibition of 2-hydroxy-4-methoxybenzylidene-aniline on phenoloxidase from *Pieris rapae*

2.5　2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺对菜青虫酚氧化酶的抑制常数

固定底物浓度，作酶活力随抑制剂浓度的变化规律图，即 Dixon 图（图 4，数据来源于图 3）。在 4 种不同底物浓度条件下的四条直线交于一点，通过计算可以求出抑制常数（K_i）为 1.96 mmol/L。

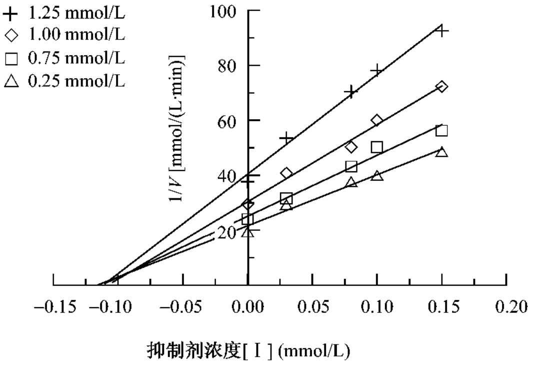

图 4　2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺动力学的狄松图

Fig. 4　Dixon diagram of 2-hydroxy-4-methoxybenzylidene-aniline

2.6　2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺对菜青虫酚氧化酶二酚酶反应进程的影响

抗坏血酸盐和半胱氨酸等还原剂可将酚氧化酶氧化 L-多巴的产物多巴醌还原成多巴（Andrawis and Varda，1986）。在还原剂存在的条件下，L-多巴的氧化产物多巴醌被还原成多巴，吸光度没有明显增加。当少量还原剂被完全氧化后，氧化产物开始形成，可通过吸光度的增加来检测到氧化产物多巴醌的生成。以半胱氨酸为参照物，以 L-多巴为底物，分别测定低浓度半胱氨酸和 2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺对酚氧化酶氧化 L-多巴的影响（图 5）。结果表明：半胱氨酸可将氧化产物多巴醌还原成多巴；在 2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺存在的条件下，多巴醌的生成曲线为通过原点的直线，即 2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺不能还原多巴的氧化产物。上述现象说明 2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺对菜青虫酚氧化酶二酚酶的抑制作用与多巴氧化产物的还原无关。

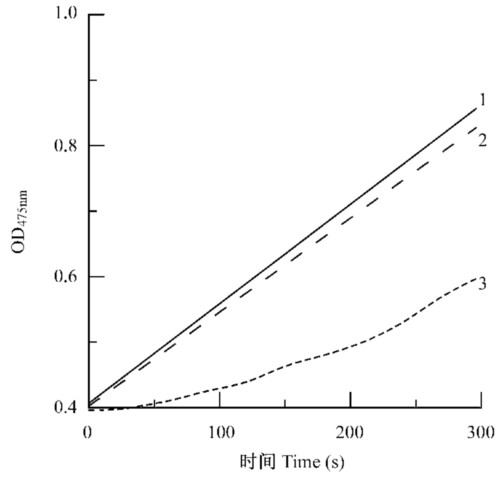

图 5　半胱氨酸和 2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺对菜青虫酚氧化酶二酚酶反应进程的影响

Fig. 5　Progress curves for the inhibition of diphenolase by cysteine and 2-hydroxy-4-methoxybenzylidene-aniline

曲线 1 为酚氧化酶与底物 L-DOPA 的反应历程 Curve 1 was the course of substrate reaction；曲线 2 为加入 2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺后酚氧化酶与底物的反应历程 Curve 2 was the course of substrate reaction with 2-hydroxy-4-methoxybenzylidene-aniline；曲线 3 为加入半胱氨酸后酚氧化酶与底物的反应历程 Curve 3 was the course of substrate reaction with cysteine.

2.7　金属铜离子和酶液对 2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺最大吸收波长的影响

图 6 为 2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺加入金属铜离子和酶液后的紫外吸收光谱。加入 Cu^{2+} 后，2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺的特征吸收峰发生明显的变化，415 nm 处的吸收峰消失，说明 Cu^{2+} 可直

接与2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺结合。另外，在含有20 μL 10 mmol/L Cu^{2+} 200 μL的测活体系中，酚氧化酶的活性明显受到抑制（表1）；然而在含有20 μL 10 mmol/L Cu^{2+}和100 μL 1 mmol/L 2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺的200 μL测活体系中，酚氧化酶的活性却较前者有所提高，因2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺在此浓度下也对该酶有抑制活性。因此，铜离子和2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺发生反应使得测活体系中抑制剂的浓度降低，从而使后者测活体系中酚氧化酶的活性较前者有所提高，这进一步说明Cu^{2+}可直接与2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺结合。

表1　Cu^{2+}和2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺对酚氧化酶抑制作用的比较

Table 1　Comparison of the inhibitory effects of Cu^{2+} and 2-hydroxy-4-methoxybenzylidene-aniline on phenoloxidase from *Pieris rapae*

效应物 Effecter	浓度（mmol/L） Concentration	相对活力（%） Relative activity
对照 CK	–	100
2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺 2-hydroxy-4-methoxybenzylidene-aniline	0.50	75
Cu^{2+}	1.00	65
2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺和Cu^{2+} 2-hydroxy-4-methoxybenzylidene-aniline and Cu^{2+}	1.50	87

为明确2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺是否可直接影响菜青虫酚氧化酶结构中的铜离子，在2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺溶液中加入酶液后观察紫外吸收峰的变化。由图6结果可看出，紫外吸收峰没有发生明显的偏移或消失，表明2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺没有与菜青虫酚氧化酶结构中的铜离子结合，说明2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺不是通过影响酶结构中的铜离子而产生抑制作用的。但是由图6也可以看出，加入酶液后，2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺UV图各吸收峰的吸光度值都有所变化，说明2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺与该酶确实发生反应，其具体作用位点还需要进一步研究。

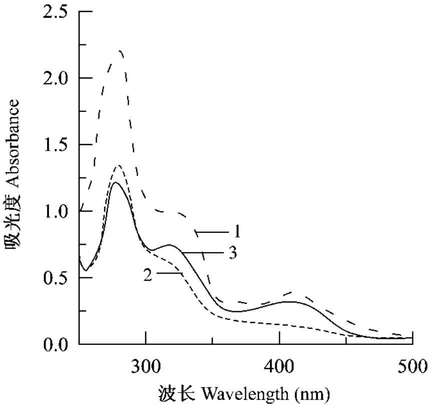

图6　2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺UV图

Fig. 6　UV-visible spectrum of 2-hydroxy-4-methoxy-benzylidene-aniline

曲线1为2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺扫描曲线 Curve 1 was the UV-visible spectrum of 2-hydroxy-4-methoxybenzylidene-aniline；**曲线2为加入Cu^{2+}后2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺的扫描曲线** Curve 2 was the UV-visible spectrum of 2-hydroxy-4-methoxybenzylidene-aniline with Cu^{2+}；**曲线3为加入酚氧化酶后2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺的扫描曲线** Curve 3 was the UV-visible spectrum of 2-hydroxy-4-methoxybenzylidene-aniline with PO.

3　讨论

本试验以L-DOPA为底物，采用酶标仪微量法研究了化合物2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺对酚氧化酶的影响。从结果可知，2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺对菜青虫酚氧化酶有较为明显的抑制作用，与以往研究的化合物相比（表2），2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺的抑制效果名列前茅，从对菜青虫酚氧化酶二酚酶反应进程的影响研究结果中，可以

表2　各种化合物对酚氧化酶抑制作用的比较

Table 2　Comparison of the inhibitory effects of several compounds on phenoloxidase from *Pieris rapae*

化合物 Compounds	IC_{50} (mmol/L)	抑制类型 Inhibitory type	K_i (mmol/L)	参考文献 References
对羟基苯甲酸 *p*-hydrobenzoic	1.667	混合型抑制 Mixed-competitive inhibition	3.33	高兴祥等，2004
5-甲基水杨酸 5-methoysalicylic	–	竞争型抑制 Competitive inhibition	6.40	高兴祥等，2004
槲皮素 Quercetin	0.111	竞争型抑制 Competitive inhibition	0.04	Wang *et al*., 2005
曲酸 Kojic acid	1.000	竞争型抑制 Competitive inhibition	0.47	王树栋等，2004
4-己基间苯二酚 4-hexylresorcinol	1.500×10^{-3}	竞争型抑制 Competitive inhibition	0.50×10^{-3}	Xue *et al*., 2006
4-十二烷基间苯二酚 4-dodecylresrcinol	0.370	竞争型抑制 Competitive inhibition	0.20	Wang *et al*., 2005b
芹菜素 Apigenin	0.150	非竞争型抑制 Noncompetitive inhibition	–	Wang *et al*., 2005a
2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺 2-hydroxy-4-methoxybenzylidene-aniline	0.116	非竞争型抑制 Noncompetitive inhibition	1.96	本文 This study

看到2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺直接作用于酚氧化酶，而不是类似半胱氨酸，通过还原氧化产物的方式间接作用于该酶（Andrawis and Varda，1986；Wang *et al*.，2005b）。其抑制类型表现为可逆非竞争型抑制作用，表明2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺既可以与游离酶（E）结合，也可以与结合酶（ES）结合，抑制剂和酶分子的结合与底物分子和酶分子的结合是相互独立的。

酚氧化酶是结构复杂的多亚基的含铜氧化还原酶，每一个亚基含2个金属铜离子，2个金属铜离子分别与蛋白质分子中2个平展的组氨酸和1个弱的直立组氨酸配体结合，另有1个内源桥基将2个铜离子联系在一起，构成酚氧化酶催化氧化反应活性中心。酚氧化酶独特的双重催化功能与酶的活性中心结构密切相关（Siegbahn，2003）。通过研究金属铜离子和酚氧化酶对2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺紫外吸收光谱的影响发现，2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺可以和铜离子作用，但并不影响菜青虫酚氧化酶活性中心的铜离子，而是因发生其他反应降低酚氧化酶的活性。

本课题组曾报道了分别以苯甲酸及其衍生物、5-甲基水杨酸、曲酸、芹菜素、栎皮酮、香草酸、芦丁、4-己基间苯二酚等化合物作为酚氧化酶的抑制剂，研究了该化合物对昆虫酚氧化酶的抑制作用。结果表明曲酸、5-甲基水杨酸和4-己基间苯二酚为竞争型抑制；苯甲酸、芹菜素和对环己基苯甲酸为非竞争型抑制；对羟基苯甲酸为混合型抑制（高兴祥等，2004；王树栋等，2004；Wang *et al*.，2005；Wang *et al*.，2005a；Wang *et al*.，2005b；Xue *et al*.，2006）。芹菜素和黄酮类化合物木犀草素与2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺一样为非竞争型抑制，可以和铜离子作用，但并不影响酚氧化酶活性中心的铜离子，而与芹菜素结构相似的槲皮素却既可以与铜离子结合，又可以和酚氧化酶活性中心的铜离子螯和（Kobu *et al*.，2000）。本研究的2-羟基-4-甲氧基苯甲醛缩苯胺对菜青虫酚氧化酶的作用方式与上述化合物表现略有不同，究其原因，可能是与其结构中羟基官能团的位置和数量的不同有关，其具体作用位点与详细机理还有待于进一步研究。

将昆虫酚氧化酶作为害虫控制剂的新‘靶标’进行研究，并探讨高活性酚氧化酶抑制剂的抑制作用及其类型，可以以这些化合物或其类似物为骨架结构，用定量结构活性相关（QSAR）技术研究抑制剂的主要理化参数与酚氧化酶活性的关系，可以指导酶抑制剂的分子设计，是寻找新型害虫控制剂的重要途径。本研究报道了一个新效应物对酚氧化酶的作用活性与抑制机理信息，会对该类化合物的进一步阐述具有指导意义。

参 考 文 献（References）

Andrawis A，Varda K，1986. Effect of methimazole on the activity of mushroom tyrosinase. *Biochemistry*，235：91－96.

Ashida M，Yamazaki H，1990. Biochemistry of the phenoloxidase system in insects：with special reference to activation. In：Ohnishi E，Ishizaki H eds. Molting and Metamorphosis. Tokyo：Japanese Science Society Press. 239－265.

Bradford MM，1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*.，72：248－254.

Feng CJ，Dai HG，Fu WJ，2004. Cloning of cDNA fragment of prophenoloxidase in larvae of Asian corn borer，*Ostrinia furnacalis* Guenée（Lepidoptera：Pyralididae）. *Journal of Nanjing Agricultural University*，27（3）：130－132.［冯从经，戴华国，符文俊，2004. 亚洲玉米螟幼虫体内酚氧化酶原cDNA片段的克隆. 南京农业大学学报，27（3）：130－132］

Friedman M，1996. Food browning and its prevention：an overview. *J. Agric. Food Chem*.，44（3）：631－653.

Gao XX，Luo WC，Xie GY，Xue CB，2003. Effects of apigenin，vanillic acid and kojic acid on the phenoloxidase activity in *Spodoptera exigua* Hübner. *Journal of Plant Resources and Environment*，12（3）：16－19.［高兴祥，罗万春，谢桂英，薛超彬，2003. 芹菜素等3种生物源化合物对甜菜夜蛾酚氧化酶的抑制作用. 植物资源与环境学报，12（3）：16－19］

Gao XX，Luo WC，Xie GY，Xue CB，Ding Q，2004. Characteristics and kinetics of inhibition of polyphenol oxidase from *Spodoptera exigua*（Lepidoptera：Noctuidae）. *Scientia Agricultura Sinica*，37（5）：687－691.［高兴祥，罗万春，谢桂英，薛超彬，丁崎，2004. 甜菜夜蛾多酚氧化酶的特性及其对曲酸等的抑制剂的反应. 中国农业科学，37（5）：687－691］

Guo Y，Zheng HP，2000. Enzymology. Guangzhou：Huanan Science University Press. 105－108.［郭勇，郑惠平，2000. 酶学. 广州：华南理工大学出版社. 105－118］

Ji LC，1991. Melanin. *Chemistry of Life*，11（1）：3－5.［季立才，1991. 黑色素. 生命的化学，11（1）：3－5］

Kobu I，Kins-Hori SK，Chaudhuri Y，Kubo Y，2000. Flavonols from *Heterotheca inuloides*：Tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. *Bioorg. Med. Chem*.，8：1 585－1 591.

Li J，Christensen BM，1993. Involvement of l-tyrosine and phenol oxidase in the tanning of *Aedes aegypti* eggs. *Insect Biochem. Mol. Biol*.，23：739－748.

Liu CY，Luo WC，Li FZ，Wang XY，2004. Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Semiothisa cinerearia* Bremer *et* Grey（Lepidoptera：Geometridae）. *Acta Entomol. Sin*.，47（2）：184－188.［刘春英，罗万春，李方正，王晓云，2004. 槐尺蠖多酚氧化酶的纯化及酶学特性. 昆虫学报，47（2）：184－188］

Lokstan M (Translated by Li SW), 1988. Insect Biochemistry. Beijing: Science Press. 151 – 153. [**罗克斯坦(李绍文译)**, 1988. **昆虫生物化学. 北京: 科学出版社**. 151 – 153]

Luo WC, Gao XX, Yu TC, Wang SD, 2005. Inhibitory effect of quercetin on the activity of phenoloxidase in *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomol. Sin.*, 48(1): 36 – 41. [**罗万春, 高兴祥, 于天丛, 王树栋**, 2005. **栎皮酮对甜菜夜蛾酚氧化酶抑制作用研究. 昆虫学报**, 48(1): 36 – 41]

Micheal RC, Kiran R, James B, 2000. Purification, characterization and molecular cloning of prophenoloxidase from *Sarcophage bullata*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 953 – 967.

Pentz ES, Wright TRF, 1991. *Drosophila melanogaster* diphenol oxidase A2: gene structure and homology with the mouse mast-cell tum-transplantation antigen, P91A. *Gene*, 103: 239 – 242.

Siegbahn EM, 2003. The catalytic cycle of tyrosinase: peroxide attack on the phenolate ring followed by O-O bond cleavage. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 8: 567 – 576.

Wang XY, Liu CY, Zhang JD, Luo WC, 2005. Inhibitory kinetics of quercetin on phenoloxidase from loopworm. *Insect Science*, 12: 435 – 441.

Wang SD, Luo WC, Gao XX, Ding Q, 2004. Inhibitory effects of kojic acid on phenoloxidase of diamondback moth *Plutella xylostella*. *Scientia Agricultura Sinica*, 37(9): 1 316 – 1 321. [**王树栋, 罗万春, 高兴祥, 丁琦**, 2004. **曲酸对小菜蛾酚氧化酶抑制作用的研究. 中国农业科学**, 37(9): 1 316 – 1 321]

Wang SD, Luo WC, Xiao T, Xue CB, 2005a. Inhibitory effects of apigenin on phenoloxidase of diamondback moth *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). *Biopesticides International*, 1(1, 2): 82 – 90.

Wang SD, Luo WC, Xu SJ, Ding Q, 2005b. Inhibitor effects of 4-dodecylresrcinol on the phenoloxidase of the diamondback moth *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). *Pestic. Biochem. Phys.*, 82: 52 – 58.

Xie GY, Luo WC, Ma C, 2003. Effect of kojic acid on phenoloxidase activity in diamondback moth. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 5(1): 68 – 72. [**谢桂英, 罗万春, 马琛**, 2003. **天然源化合物曲酸对小菜蛾酚氧化酶抑制作用初探. 农药学学报**, 5(1): 68 – 72]

Xu Y, Stokes AH, Freeman WM, Kumer SC, Vogt BA, Vrana KE, 1997. Tyrosinase mRNA is expressed in human substantia nigra. *Mol. Brain Res.*, 45: 159 – 162.

Xue CB, Chen QX, Wang Q, Ke LN, Luo WC, 2004. Comparison on properties of polyphenoloxidase from *Pieris rapae* (L.) in different stages and instars. *Acta Entomol. Sin.*, 47(3): 305 – 309. [**薛超彬, 陈清西, 王勤, 柯莉娜, 罗万春**, 2004. **菜青虫不同虫态及虫龄的多酚氧化酶性质比较. 昆虫学报**, 47(3): 305 – 309]

Xue CB, Luo WC, Chen QX, Wang Q, Ke LN, 2006. Enzymatic properties of phenoloxidase from *Pieris rapae* (Lepidoptera) larvae. *Insect Science*, 13: 251 – 256.

Xue CB, Wang Q, Ke LN, Chen QX, Luo WC, 2005. Inhibitory effect of cupferron on the activity of polyphenoloxidase from *Pieris rapae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae). *Acta Entomol. Sin.*, 48(2): 290 – 294. [**薛超彬, 王勤, 柯莉娜, 陈清西, 罗万春**, 2005. **铜铁试剂对菜青虫多酚氧化酶的抑制作用. 昆虫学报**, 48(2): 290 – 294]

Xue CB, Zhang L, Luo WC, Xie XY, Jiang L, Xiao T, 2007. 3D-QSAR and molecular docking studies of benzaldehyde thiosemicarbazone, benzaldehyde, benzoic acid, and their derivatives as phenoloxidase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15: 2 006 – 2 015.

(责任编辑: 黄玲巧)